哺乳动物 N-糖基化途径中关键酶唾液酸合酶和 CMP-唾液酸合成酶基因在转基因家蚕中的表达

汪泰初[1]，李瑞雪[1]，郭秋红[2,3]，谭安江[2,3,*]

(1. 安徽省农业科学院蚕桑研究所，合肥 230061；
2. 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所昆虫科学研究中心，上海 200032；
3. 中国科学院昆虫发育与进化生物学重点实验室，上海 200032)

摘要：对昆虫的 N-糖基化途径进行修饰改变是扩展昆虫蛋白表达系统应用范围的重要途径。本研究利用基于 *piggyBac* 转座子的家蚕 *Bombyx mori* 转基因技术表达昆虫所缺乏的哺乳类糖基化途径中的关键基因，构建了可以同时表达小鼠 *Mus musculus* 唾液酸合酶和小鼠 CMP-唾液酸合成酶两个基因的 *piggyBac* 表达载体，选用家蚕肌动蛋白 A3 启动子控制基因的表达，并导入 3×P3 启动子控制下的增强绿色荧光蛋白 EGFP 作为分子标记。在得到的 G1 代转基因家蚕中对转入的基因进行了分子水平的鉴定和分析，为在家蚕这种模式昆虫中模拟哺乳类糖基化途径奠定了基础。

关键词：糖蛋白；N-糖基化途径；家蚕；转基因；唾液酸合酶；CMP-唾液酸合成酶

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2011)08-0853-06

Germline transformation of *Bombyx mori* to express mammalian N-glycosylation enzymes sialic acid synthase and CMP-sialic acid synthetase

WANG Tai-Chu[1], LI Rui-Xue[1], GUO Qiu-Hong[2,3], TAN An-Jiang[2,3,*] (1. The Sericultural Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230061, China; 2. Research Center for Insect Sciences, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China; 3. Key Laboratory of Insect Developmental and Evolutionary Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: The N-glycosylation pathway in insects differs from the mammalian pathway, which limits insect-based expression system to produce mammalian glycoproteins with biomedical value. This study aims to produce transgenic *Bombyx mori* capable of processing glycoproteins as mammalian glycosylation pathways. Two key genes in mammalian N-glycosylation pathway, *i. e.*, mammalian sialic acid synthase and CMP-sialic acid synthetase genes, which were driven by *B. mori* actin3 promoter, were transformed into *B. mori* by *piggyBac* transgenic system. Enhanced green fluorescent protein (EGFP) which was driven by 3×P3 promoter was also introduced as a molecular selection marker. The expression of transformed genes was analyzed in G1 transgenic silkworms. The current study provides a solid evidence of simulating mammalian glycosylation pathways in the model insect *B. mori*.

Key words: Glycoprotein; N-glycosylation; *Bombyx mori*; germline transformation; sialic acid synthase; CMP-sialic acid synthetase

糖蛋白是指糖类分子与蛋白质分子以共价结合形式形成的蛋白质，而糖基化作用是最常见的蛋白质翻译后的修饰，使得蛋白质分子的性质和功能更为丰富和多样。糖基化反应是在一系列糖基转移酶催化下进行的，产生不同的聚糖(glycan)。哺乳动物的聚糖在很多关键的生物学过程中起到重要作用，比如细胞黏附、分子运输和清除、受体激活、信号转导以及内吞作用等。蛋白质糖基化产生多种聚糖类型，其中以 N-聚糖(N-glycan)、O-聚糖(O-glycan)常见并且研究较多(Udenfriend and Kodukula, 1995; Hounsell *et al*., 1996)。N-聚糖是与肽链中 N-X-S/T(其中 X 为除脯氨酸外的任何一

基金项目：国家自然科学基金杰出青年项目(30825007)；国家自然科学基金重点项目(31030060)；国家蚕桑产业技术体系合肥综合试验站(CARS-18)；安徽省蚕桑产业技术体系(ahnycytx-16)

作者简介：汪泰初，男，1970 年生，安徽池州人，硕士，副研究员，从事昆虫生理学及桑树育种栽培学研究，E-mail: 18949853828@189.cn

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: Bombyxtan@gmail.com

收稿日期 Received: 2010-12-31; 接受日期 Accepted: 2011-05-11

个氨基酸残基)顺序中天门冬酰胺(N)残基酰胺氮相连的糖链，均具有共同的五糖核心，有高甘露糖、复杂型和杂合型 3 种类型。而 O-聚糖是指通过 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)与肽链的 S/T 残基相连接的聚糖，O-聚糖也可延伸为多种不同核心结构的类型。本文只涉及 N-糖基化的相关内容，其他类型的糖基化途径将不作表述。N-糖基化途径在许多生物学过程中都具有重要作用，如蛋白质的折叠、稳定性以及蛋白质在细胞内和细胞间的定位等(Varki, 1993; Fiedler and Simons, 1996)。

人类基因组中编码的蛋白质有一半以上都存在糖基化修饰，许多在生物医学上具有重要价值的蛋白质，如抗体、细胞因子、凝血因子等都属于糖蛋白(Apweiler *et al*., 1999)。目前这些糖蛋白的大量制备基本上来源于重组蛋白的表达体系。然而由于低等真核生物糖基化途径较为简单，低等真核生物表达体系所表达的哺乳类糖蛋白很多都没有正确的活性。因此，哺乳类重组糖蛋白的表达系统需要更高等的真核生物表达系统。目前，仓鼠卵巢细胞系表达系统是应用最为广泛的重组糖蛋白生产体系。但是即使这种表达系统具有内源性的高等真核生物糖基化途径，也无法保证表达的外源糖蛋白具有完全正确的糖基化途径(Lee *et al*., 1989)，而表达量过低、成本高昂和潜在的生物危险性都是亟待解决的问题。除了以上提到哺乳类细胞系之外，转基因动物、转基因植物、昆虫病毒以及酵母表达系统都被应用于哺乳类重组糖蛋白的生产(Edmunds *et al*., 1998; Betenbaugh *et al*., 2004; Gerngross, 2004)。虽然这些表达系统都具有各自的优点，但大多数表达系统还是不能表达有正确多聚糖的重组人类糖蛋白，远远不能满足日益增长的生物医学需求。因此，开发新的能够表达具有正确糖基化途径的哺乳类重组糖蛋白表达体系具有非常重要的现实意义。

一直以来，家蚕 *Bombyx mori* 是作为生物反应器的理想材料，特别是家蚕的丝腺具有在相对短时间内大量合成并分泌蛋白的能力，是生物科学家梦寐以求的“昆虫工厂”。而通过杆状病毒感染家蚕幼虫也已经成为大量表达外源蛋白的重要途径之一(Kost *et al*., 2005)。基于昆虫杆状病毒的表达体系虽然在所表达蛋白的翻译后修饰方面具有一定的优点，但是昆虫本身的糖基化途径和更高等的真核生物还是有很大的差别。近年来，随着家蚕转基因技术的不断成熟，利用转基因家蚕不仅在基因功能分析方面取得了一定成果(Tan *et al*., 2005; Sakudoh *et al*., 2007; Ito *et al*., 2008)，在表达外源蛋白方面也有一系列成功的报道并逐渐开始走向实用化途径(Tomita *et al*., 2003; Adachi *et al*., 2006; Ogawa *et al*., 2007)。然而，利用转基因家蚕系统表达哺乳类糖蛋白同样面临着其本身的昆虫 N-糖基化途径不能正确修饰哺乳类糖蛋白的问题，目前还没有利用转基因家蚕体系表达哺乳类糖蛋白的报道。因此对家蚕本身的昆虫 N-糖基化途径进行改造是利用其表达具有正确活性的哺乳类糖蛋白的关键。本实验的最终目的是使通过转基因手段在家蚕中导入一系列哺乳类 N-糖基化途径所必需的基因，从而使转基因家蚕个体具有哺乳类动物的 N-糖基化途径，以表达具有正确 N-糖基化途径的哺乳类糖蛋白。

昆虫与哺乳动物的 N-糖基化途径有较大差别，其中一个重要的部分是昆虫体内的糖蛋白缺乏末端唾液酸残基，而唾液酸对哺乳类糖蛋白发挥正确的功能是至关重要的。因此在转基因家蚕体内表达哺乳类的唾液酸合酶(SAS)和 CMP 唾液酸合成酶(CMP-SAS)是不可或缺的步骤。本实验利用 *piggyBac* 转座子，成功构建了同时表达小鼠 *Mus musculus* 唾液酸合酶(Nakata *et al*., 2000)和小鼠 CMP 唾液酸合成酶(Münste *et al*., 1998)的转基因家蚕品系，并在分子水平上对转入基因的表达模式进行了分析，从而为进一步在转基因家蚕中模拟哺乳类 N-糖基化途径提供了理论和实际基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试虫：家蚕多化性品种 w1-pnd 为日本农业生物资源研究所提供。幼虫全龄用人工饲料或桑叶饲育。饲养温度为 25℃，相对湿度为 50%~70%。

1.1.2 主要试剂：T4 连接酶、各类限制性内切酶、PCR 相关试剂及反转录试剂盒 Protoscript M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit 均购自 NEB 公司；Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司；ECL 核酸标记及检测试剂盒购自 GE Healthcare 公司。

1.1.3 载体质粒：含有 3 × P3 启动子控制下表达增强绿色荧光蛋白 EGFP 的质粒 *pBac*[*3 × P3/EGFP*]，中间质粒 *pBacBlank*，小鼠唾液酸合酶(SAS)及小鼠 CMP-唾液酸合成酶(CMP-SAS) cDNA 材料序列均由美国圣母大学生物科学系分子生物学研究室提供。表达 *piggyBac* 转座酶的质粒 pA3Helper 由日本农业生物资源研究所提供。

1.1.4 引物：本研究所用引物及其用途详见表 1。

表 1　本研究中所用引物
Table 1　Primers used in the study

引物名称 Primer name	引物序列(5′–3′) Primer sequence	用途 Use
A3-FWD1	GGTACCGCGCGTTACCATATATGGTG	构建转基因质粒 Construction of transgenic vector
A3-REV1	GGATCCCTTGAATTAGTCTGCAAGAA	
SV40-FWD	GAGCTCAGCGGCCGCGACTCTAGATC	
SV40-REV	AAGCTTATACATTGATGAGTTTGGAC	
SAS-FWD	GGATCCATGCCGCTGGAACTGGAGCT	
SAS-REV	GAGCTCTTAAGCCTTGATTTTCTTGC	
CMP-SAS-FWD	GGATCCATGGACGCGCTGGAGAAGGG	
CMP-SAS-REV	GAGCTCTTAACTTTTTCTATCAGTAG	
A3-FWD2	AGATCTGCGCGTTACCATATATGGTG	
A3-REV2	AGATCTATACATTGATGAGTTTGGAC	
A3-FWD3	CTCGAGGCGCGTTACCATATATGGTG	
A3-REV3	CTCGAGATACATTGATGAGTTTGGAC	
South-FWD	CTAGAAAGATAATCATATTG	制作 Southern 核酸杂交探针 Preparation of Southern DNA hybridization probe
South-REV	CGATTGTTTAGCTTGTTCAG	
iPCR-FWD1	CTAATAATAAATTCAACAAAC	反向 PCR Inverse PCR
iPCR-REV1	ACCTCGATATACAGACCGAT	
iPCR-FWD2	AACTTTTATCGAATTCCTGC	
iPCR-REV2	TACGCATGATTATCTTTAAC	
SAS-RT-FWD	ATTCATGGGGGAAGACGTAT	RT-PCR
SAS-RT-REV	AATACCCGATGGGAATGTCG	
CMP-SAS-RT-FWD	AATGTGGCCAAACAGTTTGG	
CMP-SAS-RT-REV	GCTTCTCTTTTCCAAAATAG	

1.2　质粒的构建

首先，分别以 *pBacA3Helper* 和 *pBac*[*3 × P3/EGFP*]质粒为模板，通过 PCR 扩增得到家蚕肌动蛋白启动子 A3 片段。A3 片段利用 *Acc*65 Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切，SV40 利用 *Sac* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 双酶切，依次通过亚克隆导入中间质粒 *pBacBlank* 后构建了 *pBac*[*A3/SV40*]质粒。随后，利用 *Bam*H Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 双酶切位点将 PCR 扩增得到的 SAS 和 CMP-SAS 基因的完整 ORF 导入 *pBac*[*A3/SV40*]质粒后分别得到 *pBac*[*A3/SAS/SV40*] 和 *pBac*[*A3/CMP-SAS/SV40*]两个质粒。最后，以上述两个质粒为模板，PCR 扩增 A3/SAS/SV40 和 A3/CMP-SAS/SV40 片段。利用 *Xho*Ⅰ和 *Bgl*Ⅱ酶切分别导入 *pBac*[*3 × P3/EGFP/SV40*]相应的 *Xho*Ⅰ和 *Bgl*Ⅱ酶切位点，构成目的质粒 *pBac*[*A3/CMPSAS/SV40-A3/SAS/SV40-3 × P3/EGFP/SV40*]。最终完成的质粒见图 1。

1.3　显微注射及筛选转基因家蚕

在蚕卵产下 8 h 以内利用显微注射仪(Eppendorf)进行显微注射。注射质粒为目的质粒与表达转座子酶的辅助质粒 *A3Helper* 的等量混合物，总浓度为 400 ng/μL。注射后的蚕卵在 25℃下催青保护 11 d 左右至孵化。孵化后的 G0 代幼虫正常饲育至成虫期，同批次内交配产卵后在 G1 代的胚胎期 6 ~ 8 d 利用眼部特异表达的荧光蛋白标记在荧光体式显微镜(Olympus)下初步筛选出转基因家蚕。

1.4　核酸杂交检测

从 G1 代蛾中用酚氯仿法提取基因组 DNA。取 20 μg DNA 用限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ 过夜消化后，0.8% 琼脂糖电泳后转移到尼龙膜 hybondN + 上后 80℃ 2 h 烘干固定，PCR 探针的标记以及杂交和信号的检测均按照 ECL 核酸标记及检测试剂盒(GE Healthcare)的操作说明进行。用于制备探针的 PCR 片段为 *piggyBac* 质粒 3′末端的 400 bp 片段，用于扩增 PCR 片段的引物参见表 1。

1.5　反向 PCR 检测

G1 代 GFP 阳性蛾的 5 μg 基因组 DNA 用

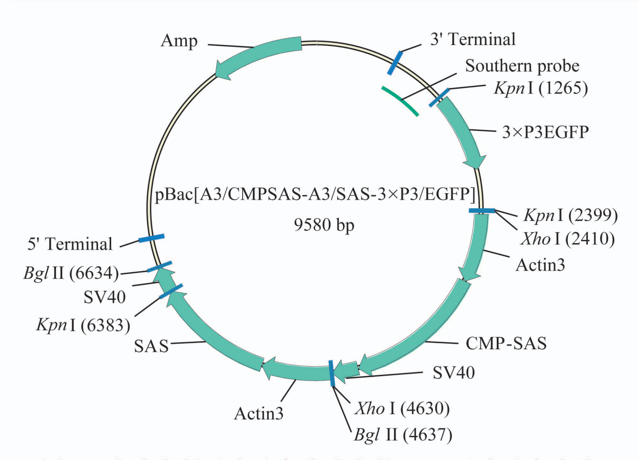


图 1 表达小鼠唾液酸合酶及小鼠 CMP 唾液酸合成酶的 *piggyBac* 转基因载体

Fig. 1 Structure of *piggyBac* vector expressing SAS and CMP-SAS under the control of *Bombyx mori* actin3 promoter

Actin3：家蚕细胞质肌动蛋白启动子 *B. mori* cytoplasmic actin promoter；SV40：多聚腺苷酸片段 Simian virus 40 polyadenylation signal；CMP-SAS：小鼠 CMP 唾液酸合成酶 Mouse CMP-sialic acid synthetase；SAS：小鼠唾液酸合酶 Mouse sialic acid synthase；3 × P3EGFP：3 × P3 启动子和增强型绿色荧光蛋白 3 × P3 promoter and enhanced green fluorescence protein；Southern probe：用于核酸杂交的片段 Probe sequence for Southern blot hybridization；Amp：Amp 抗性基因 Ampicillin resistance gene；3′ terminal，5′ terminal：3′或 5′末端反向序列 3′ or 5′ end inverted terminal repeats.

*Sau*3AI 消化后自连接。自连接环状化后的 DNA 用乙醇沉淀后溶于 50 μL 灭菌水。取 5 μL 连接产物作为第一次 PCR 反应的模板，而第一次 PCR 反应的产物则作为第二次 PCR 反应的模板。PCR 反应条件如下：94℃预变性 2 min；94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 2 min，35 个循环，72℃延伸 10 min。最终 PCR 产物直接测序，测序结果与家蚕基因组序列作比对，以确认插入位点的位置。用于第一次和第二次 PCR 的引物参见表 1。

1.6 RT-PCR 检测

G1 代 EGFP 阳性转基因 3 龄幼虫整体磨碎后，用 Trizol 试剂提取总 RNA。总 RNA 用 DNase Ⅰ 处理以消除基因组 DNA 的干扰。取 1 μg 总 RNA 利用 Protoscript M-Mulv First Strand cDNA Synthesis 试剂盒(NEB)合成单链 cDNA 作为 RT-PCR 反应的模板。PCR 反应条件同上，PCR 产物片段大小 SAS 基因为 500 bp，CMP-SAS 基因为 400 bp。用于基因特异片段扩增的特异引物参见表 1。

2 结果与分析

2.1 转基因家蚕品系的建立

以转基因为目的的蚕卵注射的最适时期是胚子发育的原核期，即蚕卵产下后 8 h 以内。本实验中采用目的质粒和辅助质粒的混合物共注射了 712 粒卵，孵化幼虫 382 头，孵化率为 53.6%。孵化幼虫全龄人工饲料饲养至成虫，最终在 69 对同批次内自交蛾区中鉴定出有 5 个卵圈存在复眼部位表达绿色荧光蛋白的蚕卵(图 2)，转化率约为 7.3%。在每一卵圈约 200 ~ 300 粒卵中，荧光蚕卵数从数头至数十头不等(结果未显示)。在随后的饲育过程中，最终保留了两个独立的转基因家蚕品系。这些转基因家蚕无论是卵期还是在成虫期均在眼部表达绿色荧光蛋白 EGFP，证实 3 × P3 启动子在家蚕里对基因的调控非常稳定。

2.2 DNA 核酸杂交检测插入位点

DNA 核酸杂交实验是验证是否成功得到转基因动物的重要手段。另一方面，因为 *piggyBac* 转座子往往会在基因组上产生一个至数个插入位点，DNA 核酸杂交实验也是确认 *piggyBac* 插入位点数目的重要手段。绿色荧光蛋白阳性的G1代蛾个体



图 2 3 × P3 启动子控制下绿色荧光蛋白 EGFP 在 G1 代转基因家蚕的卵期和成虫期眼部的表达

Fig. 2 Expression of EGFP in the compound eyes of G1 transgenic silkworm (*Bombyx mori*) under the control of 3 × P3 promoter

A：EGFP 阳性的 G1 代蚕卵 EGFP positive embryo；B：EGFP 阳性的 G1 代蛾 EGFP positive moth；C：对照蛾 Control moth.

中提取的基因组 DNA 用 *Kpn* Ⅰ 消化后与基于 *piggyBac* 的 3′末端序列的探针杂交后结果显示，在 G1 代家蚕进行检测的两个独立品系中，有一个品系只有一个插入位点，而另外一个品系有两个插入位点(图 3)。

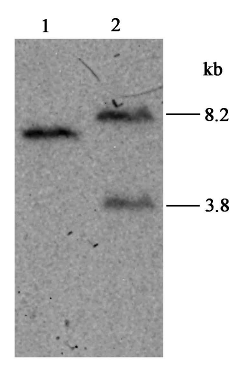


图 3　转基因家蚕内的 Southern DNA 核酸杂交检测

Fig. 3　Southern DNA hybridization analysis of G1 transgenic silkworm (*Bombyx mori*)

1：转基因品系 1 Transgenic line 1；2：转基因品系 2 Transgenic line 2.

2.3　反向 PCR 确定插入序列

为了分析转入的外源基因在家蚕基因组上的具体位置，我们利用反向 PCR 对只有一个插入位点的品系进行了分析。得到的 PCR 产物约为 310 bp，测序结果表明其中 250 bp 为 *piggyBac* 质粒 3′末端片段，而其中一段 63 bp 的片段序列为 5′-GATCTTCATCAGAATTATACTAATGTAAGCAAAAGGTAACTATGAAGTATATGCTATATTTAA-3′。这段序列与家蚕基因组第 5 号染色体上的 chr5：12 290 155 ~ 12 290 093 序列完全吻合，证明 *piggyBac* 已经携带外源基因整合到基因组上。

2.4　RT-PCR 确认基因的表达

能够正确表达外源基因是转基因工作的最终目的，而在转录水平上检测外源基因的表达是必不可少的步骤。本实验以 G1 代转基因家蚕的 cDNA 为模板，分别用 SAS 和 CMP-SAS 基因的特异引物进行了 PCR 扩增。预期 SAS 和 CMP-SAS 基因的 PCR 产物大小分别为 500 bp 和 400 bp。PCR 反应的产物大小和预期完全吻合(图 4)，而随后的测序结果证实了这些 PCR 产物都是正确的基因片段，从而证明这两个导入的外源基因都能在转基因家蚕体内得到正确表达。

3　讨论

与哺乳类糖蛋白的 N-糖基化途径的复杂程度相比，昆虫的 N-糖基化途径相对简单。因此，对昆虫的 N-糖基化途径进行修饰是利用昆虫表达系统来表达哺乳类糖蛋白的关键。N-糖基化途径的一个重要组成部分是为 N-糖原添加末端残基。N-糖原的末端残基在糖蛋白功能中起着重要作用，如细胞间相互作用、免疫反应和清除循环糖蛋白等(Marchal *et al*., 2001)。唾液酸残基通常是作为哺乳类 N-糖原的末端残基，而在大多数昆虫体内的内源性糖蛋白都缺乏唾液酸，如昆虫杆状病毒表达体系所表达的糖蛋白就缺乏末端唾液酸残基。因此在昆虫中模拟哺乳类糖基化途径所需要的一系列辅助酶中，唾液酸合酶(SAS)和 CMP 唾液酸合成酶(CMP-SAS)是不可缺少的。在果蝇里，只在胚子发育 14 ~ 18 h 左右检测出唾液酸的存在，表明唾液酸的表达模式是随着发育时期具有特异性的(Roth *et al*., 1992)。虽然在家蚕中唾液酸的表达模式尚不清楚，但在本实验中，我们通过转基因手段使小鼠唾液酸合酶及小鼠 CMP 唾液酸合成酶在家蚕体内持续表达，这些结果为今后模拟哺乳类糖蛋白的 N-糖基化途径提供了可能性。

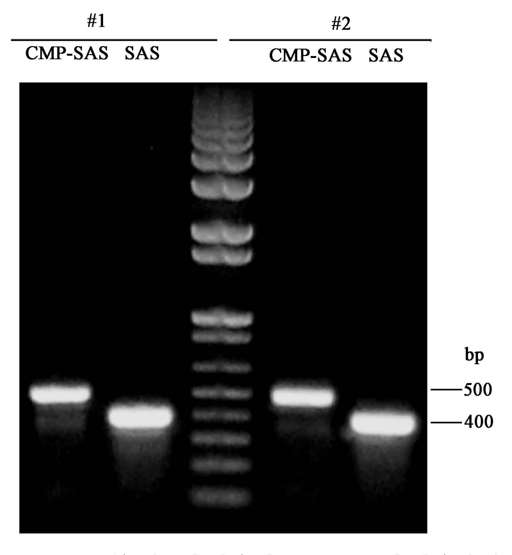


图 4　RT-PCR 检测唾液酸合酶和 CMP 唾液酸合成酶基因在转基因家蚕体内的表达

Fig. 4　RT-PCR analysis of expression of CMP-SAS and SAS genes in transgenic silkworm (*Bombyx mori*)

自 Tamura 等(2000)首先利用 *piggyBac* 转座子在家蚕中成功开展了转基因工作以后，基于 *piggyBac* 转座子的家蚕转基因体系已经广泛应用于基因的功能分析，以及突变体的拯救恢复和外源蛋白的大量表达等各个方面，取得了一系列的成果。可以预见，一直以来在生物反应器的开发方面具有

重要意义的家蚕表达体系也必将在大量表达哺乳类糖蛋白的应用方面发挥极其重要的作用，而家蚕转基因研究的不断进步则会大大加快应用的步伐。到目前为止，还没有利用多细胞生物进行糖基化途径修饰的报道，同样也没有利用转基因昆虫作为生物反应器表达重组糖蛋白的报道。本实验利用 *piggyBac* 转座子成功建立了表达小鼠唾液酸合酶及小鼠 CMP 唾液酸合成酶两个哺乳类 N-糖基化途径的必须基因，转基因效率为 7.3%，与在其他昆虫中开展的转基因工作效率类似，基本可以满足将来实用化的需求。

本实验是一系列工作中的初步尝试，采取了目前在转基因家蚕中应用最为广泛和表达稳定的家蚕肌动蛋白 A3 启动子来调控外源基因的表达。而充分利用家蚕丝腺大量合成分泌蛋白的能力，采用丝腺的特异启动子（丝素重链、丝素轻链和丝胶蛋白等）来表达外源蛋白是势在必行的工作。另外，导入基因的活性鉴定，标靶糖蛋白的导入和活性鉴定也都是不可或缺的工作。这些研究内容都将在我们进一步的工作中逐步展开。

参考文献（References）

Adachi T, Tomita M, Shimizu K, Ogawa S, Yoshizato K, 2006. Generation of hybrid transgenic silkworms that express *Bombyx mori* prolyl-hydroxylase α-subunits and human collagens in posterior silk glands: production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues. *Journal of Biotechnology*, 126: 205 – 219.

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N, 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473: 4 – 8.

Betenbaugh MJ, Tomiya N, Narang S, Hsu JT, Lee YC, 2004. Biosynthesis of human-type N-glycans in heterologous systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14: 601 – 606.

Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J, Hanson E, Bernasconi R, Higgins E, Manavalan P, Ziomek C, Meade H, McPherson JM, Cole ES, 1998. Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood*, 91(12): 4561 – 4571.

Fiedler K, Simons K, 1995. Characterization of ViP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins. *J. Cell Sci.*, 109: 271 – 276.

Gerngross TU, 2004. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.*, 22(11): 1409 – 1414.

Hounsell EF, Davies MJ, Renou DV, 1996. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj. J.*, 13: 19 – 26.

Ito K, Kidokoro K, Sezutsu H, Nohata J, Yamamoto K, Kobayashi I, Uchino K, Kalyebi A, Eguchi R, Hara W, Tamura T, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Kadono-Okuda K, 2008. Deletion of a gene encoding an amino acid transporter in the midgut membrane causes resistance to a *Bombyx* parvo-like virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(21): 7523 – 7527.

Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL, 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 23(5): 567 – 575.

Lee EU, Roth J, Paulson JC, 1989. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2, 6-sialyltransferase. *J. Biol. Chem.*, 264(23): 13848 – 13855.

Marchal I, Jarvis DL, Cacan R, Verbert A, 2001. Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol. Chem.*, 382: 151 – 159.

Münster AK, Eckhardt M, Potvin B, Mühlenhoff M, Stanley P, Gerardy-Schahn R, 1998. Mammalian cytidine 5′-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9140 – 9145.

Nakata D, Close BE, Colley KJ, Matsuda T, Kitajima K, 2000. Molecular cloning and expression of the mouse N-acetylneuraminic acid 9-phosphate synthase which does not have deaminoneuraminic acid (KDN) 9-phosphate synthase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 273: 642 – 648.

Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, 2007. Generation of transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *J. Biotechmol.*, 128(3): 531 – 544.

Roth J, Kempf A, Reuter G, Schauer R, Gehring WJ, 1992. Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 256: 673 – 675.

Sakudoh T, Sezutsu H, Nakashima T, Kobayashi I, Fujimoto H, Uchino K, Banno Y, Iwano H, Maekawa H, Tamura T, Kataoka H, Tsuchida K, 2007. Carotenoid silk coloration is controlled by a carotenoid-binding protein, a product of the *Yellow blood* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(21): 8941 – 8946.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Maucham PB, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*, 18(1): 81 – 84.

Tan AJ, Tanaka H, Tamura T, Shiotsuki T, 2005. Precocious metamorphosis in transgenic silkworms overexpressing juvenile hormone esterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(33): 11751 – 11756.

Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type Ⅲ procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.*, 21: 52 – 56.

Udenfriend S, Kodukula K, 1995. How glycosylphos-phatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Ann. Rev. Biochem.*, 64: 593 – 591.

Varki A, 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2): 97 – 130.

（责任编辑：赵利辉）